

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-040944
(43)Date of publication of application : 15.02.1994

(51)Int.CI.

A61K 37/64
A61K 37/64
C12N 9/99
// C12P 21/02
(C12P 21/02
C12R 1:225)

(21)Application number : 04-197239

(71)Applicant : CALPIS FOOD IND CO LTD:THE

(22)Date of filing : 23.07.1992

(72)Inventor : NAKAMURA YASUNORI
TAKANO TOSHIAKI

(54) INHIBITOR OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an industrially extremely effective angiotensin converting enzyme inhibitor capable of exhibiting excellent activity inhibiting the angiotensin converting enzyme by a very small amount of oral administration, inexpensively and readily producing.

CONSTITUTION: The angiotensin converting enzyme inhibitor contains a peptide containing Val-Pro-Pro and having 3-10 amino acid residue number as an active ingredient. This inhibitor is produced by subjecting a food raw material containing a peptide composed of Val-Pro-Pro to fermentation treatment with lactic acid bacteria.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-40944

(43)公開日 平成6年(1994)2月15日

(51)Int.Cl.⁵
A 61 K 37/64
C 12 N 9/99
// C 12 P 21/02
(C 12 P 21/02)
識別記号 ABU
A E Q
ZNA A
府内整理番号 8314-4C
F I
技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数2(全6頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-197239	(71)出願人	000104353 カルビス食品工業株式会社 東京都渋谷区恵比寿西2丁目20番3号
(22)出願日	平成4年(1992)7月23日	(72)発明者	中村 康則 神奈川県横浜市港北区新吉田町1856番地5 A-105
		(72)発明者	高野 俊明 神奈川県川崎市麻生区細山1丁目7番3号
		(74)代理人	弁理士 酒井 一 (外1名)

(54)【発明の名称】 アンジオテンシン変換酵素阻害剤及びその製造法

(57)【要約】

【構成】 Val-Pro-Proを含有し、アミノ酸残基数が3～10のペプチドを有効成分とするアンジオテンシン変換酵素阻害剤並びにVal-Pro-Proを構成成分とするペプチドを含む食品素材を、乳酸菌により発酵処理する前記アンジオテンシン変換酵素阻害剤の製造法。

【効果】 本発明のアンジオテンシン変換酵素阻害剤は、特定のペプチドを有効成分とするので、微量の経口投与により優れたアンジオテンシン変換酵素阻害活性を示す。また本発明の製造法では、該アンジオテンシン変換酵素阻害剤を、安価に且つ容易に製造することができ、工業的にも極めて有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Val-Pro-Proを含有し、アミノ酸残基数が3～10のペプチドを有効成分とするアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項2】 Val-Pro-Proを構成成分とするペプチドを含む食品素材を、乳酸菌により発酵処理することを特徴とする請求項1記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、Val-Pro-Proを含有する特定のアミノ酸残基数を有するペプチドを有効成分とするアンジオテンシン変換酵素阻害剤とその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 アンジオテンシン変換酵素（以下ACEと称す）は、主に肺や血管内皮細胞に存在し、レニンにより分解されたアンジオテンシンI (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)に作用してC末端よりジペプチド(His-Leu)を遊離させ、強力な血圧上昇作用を有するアンジオテンシンIIを生成させる。また、この酵素は、降圧作用を有するブラジキニンを分解し、不活性化する作用を合せもつ。このようにACEは、昇圧ペプチド（アンジオテンシンII）を生じさせると共に、一方では降圧ペプチド（ブラジキニン）を分解、不活性化するので、結果として血圧を上昇させる作用を示す。従って、この酵素活性を阻害することにより、血圧上昇を抑制させる物質が種々開発されている。

【0003】 ACE阻害物質としては、蛇毒ペプチドをはじめとして、天然物、合成物が多数報告されており、カブトブリル（D-2-メチル-3-メルカブトプロパンオイル-L-プロリン）等の合成物質は既に経口降圧剤として実用化されている。しかし、これら医薬品は、多くの場合、副作用等を有し常に安全性の問題に注意を払わなければならない。低毒性で安全性の高い降圧剤を期待し、食品原料由来のACE阻害物質が各方面で研究されており、例えばカゼイン [Susumu MARUYAMA et al. A.B.C., 51(9), 2557～2561 (1987)]、魚肉蛋白質 [受田浩之, 日本農芸化学会誌, 66(1), 25～29(1992)] 等の酵素分解物から得られるACE阻害ペプチド等が報告されている。

【0004】しかし、経口投与により有効なデータを示すものは少なく、安全で微量の経口投与（摂取）によって、有効な降圧物質の開発が望まれている。

【0005】これまで乳酸菌菌体成分には、ACE阻害能あるいは降圧作用があることが知られている [伊藤整, 医学と生物, 116(3), 159-161(1988)、特開平2-247127号公報]。また発酵乳から菌体、カゼインを除去して得られる分子量5000以上の高分子物質が降圧作用を有することが報告されている（特開昭61-5

10

20

30

40

50

3216号公報）が、このような菌体成分以外についての報告はほとんどなされていないのが現状である。

【0006】一方トリペプチドVal-Pro-Proは、Ra oらによってコラーゲンの部分構成物として合成され、ラセミ化現象解明の為の材料の一つとして報告されている [RAO S. RAPAKA, R.S. BHATNAGAR, and D.E. NITECKI, BIOPOLYMERS, 15, 317-324(1976)] が、ACE阻害活性を有することについては知られていない。また該トリペプチドVal-Pro-Proは、化学合成により製造するのが困難であり、工業的にも容易に製造できる方法の開発が望まれている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、安全性が高く、微量の経口投与（摂取）で有効なACE阻害活性を有し、医薬品、機能性食品として使用できるACE阻害剤及びその製造法を提供することにある。

【0008】 本発明の別の目的は、前記ACE阻害剤を安価且つ容易に製造することができる方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】 本発明によれば、Val-Pro-Proを含有し、アミノ酸残基数が3～10のペプチドを有効成分とするアンジオテンシン変換酵素阻害剤が提供される。

【0010】 また本発明によれば、Val-Pro-Proを構成成分とするペプチドを含む食品素材を、乳酸菌により発酵処理することを特徴とする前記アンジオテンシン変換酵素阻害剤の製造法が提供される。

【0011】 以下本発明を更に詳細に説明する。

【0012】 本発明のACE阻害剤において、有効成分として用いるペプチドは、Val-Pro-Proを含有し、且つアミノ酸残基数が3～10のペプチドであれば良く、通常塩酸塩、硫酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩等の製薬工業上許容される塩を附加したペプチド等であっても良い。この際Val-Pro-Proに結合する他のアミノ酸残基は、N末端側に結合するのが好ましく、また他のアミノ酸残基数は、少ない方が好ましい。具体的には例えば、後述する配列表に示されるVal-Pro-Pro、Val-Val-Pro-Pro、Val-Val-Val-Pro-Pro、Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro、Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Pro-Pro、Leu-u-Val-Pro-Pro、Phe-Leu-Val-Pro-Pro、Pro-Val-Pro-Pro、Ala-Pro-Val-Pro-Pro等のアミノ酸配列で表されるペプチド又はこれらの塩付加物等を好ましく挙げることができ、使用に際しては単独若しくは混合物として用いることができる。

【0013】 本発明のACE阻害剤に使用する前記Val-Pro-Proを含有し、且つアミノ酸残基数が3～10のペプチドを調製するには、後述する本発明の製造法により得ができる他、獣乳の全乳、脱脂乳、カゼイン等の乳タンパク質成分；とうもろこし、コーンタンパク、

小麦、小麦タンパク、大豆、脱脂大豆、大豆タンパク等を酵素加水分解処理する方法或いは通常の有機化学的合成法等によっても製造することができる。

【0014】本発明のACE阻害剤は、前記特定のペプチドを含んでおれば良く、例えば医薬上許容される他の添加物又は飲食品等を添加して用いることができ、その剤型は、固形状、液状等として、経口投与等により摂取することができる。またその投与量は、予防あるいは、治療目的により異り、また症状の進行課程によつても変化するが、成人の治療又は予防のために投与する場合には、有効成分である前記特定のペプチド量換算で、一日当たり、好ましくは0.1mg～100mg、好ましくは1～30mgの範囲である。

【0015】本発明のACE阻害剤の製造法では、Val-Pro-Proを構成成分とするペプチドを含む食品素材（以下食品素材Aと称す）を、乳酸菌により発酵処理することにより得ることができる。

【0016】前記食品素材Aとしては、例えば獣乳の全乳、脱脂乳、カゼイン等の乳タンパク質成分；とうもろこし、コーンタンパク、小麦、小麦タンパク、大豆、脱脂大豆、大豆タンパク等を好ましく挙げることができ。また前記乳酸菌としては、例えばラクトバチルス・ヘルベティカス（*Lactobacillus helveticus*）、ラクトバチルス・デルブルィキィ・サブスペシーズ・ブルガリカス（*Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*）等のラクトバチルス属に属する乳酸菌；ラクトコッカス・ラクティス（*Lactococcus lactis*）等のラクトコッカス属に属する乳酸菌；ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスペシーズ・サーモフィラス（*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*）等のストレプトコッカス属に属する乳酸菌；ロイコノストック・ラクテス（*Leuconostoc lactis*）等のロイコノストック属に属する乳酸菌；ビフィドバクテリウム・ロンガム（*Bifidobacterium longum*）、ビフィドバクテリウム・ブレベ（*Bifidobacterium breve*）等のビフィドバクテリウム属に属する乳酸菌等を好ましく挙げることができ、使用に際しては、酵母等との混合物として用いることもできる。この際前記酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）等のサッカロマイセス属に属する酵母菌；カンディダ・ウチリス（*Candida utilis*）等のカンディダ属に属する酵母菌；クルイベロマイセス・マルキサンス・バー・ラクティス（*Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*）等のクルイベロマイセス属に属する酵母菌又はこれらの混合物等を好ましく挙げができる。

【0017】本発明の製造法において、前記食品素材Aを、乳酸菌により発酵処理する際の条件は、乳酸菌の種類又はその組合せ等により異なるが、好ましくは、前記食品素材Aを、例えば水等により溶液状とした後、乳酸菌を添加して培養することにより発酵処理するこ

ができる。この際培養温度は25～45°C、培養時間は3～72時間の範囲で行うのが好ましく、特に乳酸菌を効果的に作用させるために、培養開始時のpHを6～7に調整するのが望ましい。培養の終了点は、例えば乳酸菌数が、10⁷個/m1以上またはpH 5.5以下になった時点で判断することができる。また該培養を行う際の乳酸菌の配合割合は、食品素材A溶液に対して、菌数で約5×10⁶個/m1とするのが好ましい。更に前記培養は、複数回に分けて行うこともできる。

【0018】本発明の製造法により得られる発酵乳は、そのままACE阻害剤の有効成分として用いることができるが、有効成分以外の例えば苦み成分等を除去するために、種々の生化学的方法、カラムクロマトグラフィー等により精製して用いることも可能である。この際得られる発酵乳中に含まれる前記有効成分として用いるVal-Pro-Proを含有するペプチドの含有量は、発酵乳100m1あたり、1～4mgであるので、該発酵乳をそのまま本発明のACE阻害剤として用いる場合には、その投与量は、成人一日当たり好ましくは10m1～1000m1、特に好ましくは50～300m1の範囲である。

【0019】

【発明の効果】本発明のACE阻害剤は、特定のペプチドを有効成分とするので、微量の経口投与により優れたACE阻害活性を示す。また本発明の製造法では、該ACE阻害剤を、安価に且つ容易に製造することができ、工業的にも極めて有効である。

【0020】

【実施例】以下本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0021】

【実施例1】

発酵乳aの調製

脱脂粉乳9gを水100gに溶解し、115°C、20分間殺菌した後、室温まで冷却してラクトバチルス・ヘルベティカス（*Lactobacillus helveticus*）を一白金耳接種し、37°Cで24時間培養を行なって、1次スターター（乳酸菌数5×10⁶個/m1、pH 3.5）を調製した。次いで脱脂粉乳180gを水2Kgに溶解し、90°C達温殺菌した後室温まで冷却して、前記1次スターを接種した。更に、37°Cで24時間培養を行ない、これを2次スターとした。次に、脱脂粉乳4.5Kgを水50Kgに溶解し、90°C達温殺菌した後室温まで冷却して、前記2次スターを接種し、37°Cで24時間培養を行ない、発酵乳a約56Kgを得た。

【0022】発酵乳中に含有されるペプチドbの定量

前記得られた発酵乳a 1m1を10,000r.p.m.、5分間遠心し、得られた上清を商品名「セントリコン-30」（分画分子量30,000、アミコン社製）にて遠心濾過した。次いで濾液を逆相カラム（商品名「TSK-gel Octadecyl-4PW」、東ソー株式会社製）を使用したHPLC

Cに供し、0.1重量%TFA(トリフルオロ酢酸)水溶液にて溶出される非吸着画分を収集し凍結乾燥した。次に0.1重量%TFA水溶液の少量に溶解した後、下記条件により定量分析を行なった。その結果得られたペプチドをスタンダードとして用い濁液中に含まれるペプチドbの重量を算出したところ発酵乳a 5.6Kg中にペプチドb 1.65gが含まれていた。

**【0023】カラム：ウオーターズ社製、マイクロポン
ダスフェアー5μC18**

溶出条件：A液：0.1重量%TFA水溶液
B液：0.1重量%TFA入りアセトニトリル
(B/A+B) × 100(%) : 0% → 0% (5分) → 40% (65分)

流速 : 1mL/分、検出 : 215nmの紫外
部吸收

【0024】ペプチドbの調製

次いで得られた発酵乳a中に含まれるペプチドを精製するため以下に示す精製工程を行なった。

【0025】得られた発酵乳a 6リットルを10N NaOH溶液でpH7.3付近に調整した後、商品名「Amberlite XAD-2」(オルガノ社製)樹脂約1リットルを加え、更に蒸留水を加えて全量を約20リットルとした。90分間攪拌後、晒し布でろ過して樹脂を回収した。蒸留水20リットルにて該樹脂を洗浄後、メタノール1リットルに添加し、30分間攪拌した。次にナイロンウール(200メッシュ)を用いて濾過し、更に硬質濾紙で吸引ろ過後、濾液をエバボレータにて55°C、減圧濃縮し200mLを得た。この濃縮液に商品名「Amberlite IRA-400」(OH形)(オルガノ社製)250mLを加えスパテールで攪拌し、液の黄色味を除去した。次いで硬質濾紙にて吸引濾過し濾液を1N塩酸溶液にてpH7に調整後、凍結乾燥した。得られた乾燥物を少量の蒸留水に溶解し、カラム(商品名「Sephadex G-25」、ファルマシア社製)に供した。その後蒸留水にて溶出し、活性フランクションを収集し凍結乾燥して粉末5.0mgを得た。この乾燥粉末を0.05酢酸緩衝液(pH4.5)に溶解した後、同緩衝液で平衡化したカラム(商品名「Sephadex G-25」、ファルマシア社製)にかけ同緩衝液にて溶出し、活性フラクションを集め凍結乾燥を行なった。次に得られた凍結乾燥物を、0.1重量%TFA水溶液の少量に溶解した後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分離を行なった。HPLCは逆相カラム(商品名「M&SパックC18」、エムエス機器社製)を使用し、0.1重量%TFA入り2-ブロパノール/アセトニトリル(7:3)を溶媒とし、0~40%(60分)の直線勾配にて分離し、ACE阻害活性を有し、単一なピークを示すペプチドbを1mg得た。

【0026】次いで得られたペプチドbについて、下記に示す各方法に従って分析を行なった。

【0027】アミノ酸組成

定沸点6N塩酸に得られたペプチドb 1μgを溶解し、真空中110°Cにて24時間加水分解し、商品名「日立L-8500型アミノ酸分析計」(日立製作所株式会社製)によるニンヒドリン発色法にて組成分析を行なったところ、Val:Pro(モル比)は1.00:2.08であった。

【0028】アミノ酸配列

商品名「島津プロテインシーケンサー PSQ-1型」(島津製作所株式会社製)によるN末端アミノ酸配列分析を測定した結果、N末端:Val-Pro-Proであった。

【0029】ACE阻害活性の測定

CheungとCushmanの方法[D. W. Cushman and H. S. Cheung, Biochem. Pharmacol., 20 1637(1971)]に準じて行なった。

【0030】即ち、前記調製したペプチドbを0.1Mホウ酸緩衝液(0.3M NaClを含む、pH8.3)を用いて濃度1.2.5.25.0.50.0.10.0.200μg/mLに調整した後、夫々を試験管に0.08mL入れ、これに基質として0.1Mホウ酸緩衝液(0.3M NaClを含む、pH8.3)で5mMに調整したヒブリルヒスチジルロイシン(Hip-His-Leu、シグマ社製)0.2mLを添加し、更に酵素水溶液(0.1u/mL、シグマ社製)0.02mLを添加し、37°C、30分間反応させた。その後、1N塩酸0.25mLを添加して反応を停止させた後、1.7mLの酢酸エチルを加え20秒間攪拌した。次いで3000rpmで10分間遠心して酢酸エチル層1.4mLを採取した後、120°C、40分間加熱し、溶媒を除去した。溶媒除去後、蒸留水1mLを加え、抽出されたヒブリル酸の吸収228nm値を測定し、これをACE阻害活性とした。阻害率は下記式より算出した。その結果阻害率50%の時の阻害剤濃度IC₅₀を求めたところ、得られたペプチドbは14μMであった。

【0031】

阻害率 = [(A-B)/(A-C)] × 100 (%)
A: 試料(ペプチドb)を含まない場合の228nmの吸光度

B: 試料(ペプチドb)を添加した場合の228nmの吸光度

C: 酵素及び試料(ペプチドb)を添加しない場合の228nmの吸光度

【0032】ラット経口投与時の降圧作用の測定

次に得られた発酵乳a及びペプチドbについて下記に示す方法に従って降圧作用を測定した。

【0033】20週令・雄の自然発症高血圧(SHR)ラット(日本チャールスリバー社、1群4匹)を温度23±2°C、湿度55±5%の動物室中、水及び飼料(日本クレア製、商品名「CE-2」)は、自由摂取とし

て、馴化飼育したものを被験動物として用いた。試験前日より1晩絶食させたSHRに、生理食塩水(2ml/ラット)、発酵乳a(2ml/ラット)及び生理食塩水2mlに溶解したペプチドb(150μg/ラット)を胃ゾンデにより強制経口投与した。投与直前、投与4時間後、投与8時間後に、それぞれ血圧を測定した。血圧*

*の測定には、無加温、非観血的ラット血圧計(シーエスアイ社製、商品名「PE-300型」)を用いtail-cuff法にて測定した。投与直前の血圧と4時間後及び8時間後の血圧との差(血圧降下)の結果を表1に示す。

【0034】

【表1】

試料	4時間後	8時間後
生理食塩水(対照区)	-0.5mmHg	-2.4mmHg
発酵乳a	-37.0mmHg	-31.5mmHg
ペプチドb	-32.0mmHg	-26.5mmHg

【0035】

【実施例2】実施例1で得られた発酵乳a 5.5Kgに、商品名「Amberlite XAD-2」(オルガノ社製) 5Kgを添加し、室温で90分間攪拌後、晒し布で濾過して樹脂を回収した。水10リットルにて樹脂を洗浄後エタノール2.5リットルに添加し、30分間攪拌した。さらにナイロンウール(200メッシュ)を用いてろ過し、更に硬質濾紙で吸引ろ過後、濾液をエバボレーターにて5°C減圧濃縮し、更に凍結乾燥し、粉末約3.1gを得た。実施例1の発酵乳中に含有されるペプチドの定量と同様な方法によって定量を行なったところ、ペプチドb 0.4gが含まれていた。

【0036】次に乳糖40.0重量部、ショ糖34.8重量部、トウガント末5.0重量部、ペパーミント油0.2重量部を混合した後、前記ペプチド粉末20.0重量部を蒸留水20.0重量部に溶解した溶液を添加し十分に練合した。次いで得られた練合物を、デンブンを散布したガラス板上にて展延し、シート状とした後型で打ち抜き乾燥しトローチ剤を得た(1g/個)。

【0037】

【配列表】

【0038】配列番号：1

配列の長さ：3

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Pro Pro

1 2 3

【0039】配列番号：2

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Val Pro Pro

1 2 3 4

【0040】配列番号：3

配列の長さ：5

20 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Val Val Pro Pro

1 5

【0041】配列番号：4

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：ペプチド

配列

Pro Val Val Val Pro Pro

1 5

【0042】配列番号：5

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Leu Thr Gin Thr Pro Val Val Val Pro Pro

1 5 10

【0043】配列番号：6

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Leu Val Pro Pro

1 2 3 4

50 【0044】配列番号：7

(6)

特開平6-40944

9

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Phe Leu Val Pro Pro

1

5

【0045】配列番号：8

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列

Pro Val Pro Pro

1 2 3 4

【0046】配列番号：9

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Pro Val Pro Pro

1

5

10

*

フロントページの続き

(51)Int.Cl.³

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:225)